

# テラヘルツ波分光による生体分子の検出

尾内 敏彦

## Detection of Biomolecules Using Terahertz Wave Spectroscopy

Toshihiko OUCHI

It is necessary to hold hydrated small amount of biomolecule samples for clinical applications of terahertz (THz) spectrum technology. A micro-filter membrane enables us to apply samples in solution uniformly without conformational disease even after evaporation. We measured a reproducible database of THz transmittance spectrum for a group of nucleo-base, proteins and physiologically active substances including hormones. We developed also a high sensitive integrated sensor chip for diagnosis with minute volume of samples. Less than 10 fmol distinction of double and single strand DNAs as well as less than 10  $\mu\text{g}$  identification of saccharide powder were realized.

**Key words:** terahertz TDS system, biomolecules, membrane device, transmission line sensor

テラヘルツ波分光の応用のひとつとして、医療および薬学研究分野が期待されている。特に、DNA、タンパク質などの生体分子では、分子構造全体にわたる集団的な振動モードやわずかな分子修飾の違いによる振動モード変化などがテラヘルツ領域に存在し、生体分子の構造形成および機能発現に関連していると予想されており、構造分析や臨床診断の研究が盛んに行われている。たとえば、DNAにおいて2本鎖/1本鎖の判別をテラヘルツ時間領域分光(TDS)システムによる簡便な透過測定で可能なことが提示されている<sup>1)</sup>。この結果は、2つの状態の違いを複素屈折率の差としてラベルフリーで判別できることを示しており、従来の蛍光や放射性同位元素などのラベルを用いることなく簡便に検査ができる可能性がある。また、タンパク質では、牛血清アルブミンにおける構造変化の判別可能性について示唆されている<sup>2)</sup>。

このような生体分子は多くの場合溶液の状態で供給されるが、テラヘルツ波分光では、分子の構造を保ったまま破壊せずにサンプルを準備し、かつ水の影響を低減して高感度に測定することが課題となっている。また、これらの生体分子等の分析、診断を実用化するにあたって共通していることは、非常に微量な検体で計測する必要があることである。従来のTHz-TDSではこのような液体サンプルへの対応や高感度な測定が十分ではなく、テラヘルツ波分

光の特徴を生かした新しい計測システムが望まれている。

### 1. フィルターメンブレンを用いた測定

生体分子等の溶液サンプルを用いてテラヘルツ波の透過センシングにより精度の高い分光データを取得するためには、面内均一性の高い分子の塗布が必須となる。われわれは、生体分子溶液を滴下するための9個のウェルが形成され、ウェル内部に分子吸着用のマイクロフィルターメンブレンが装着されたデバイスを開発した<sup>3)</sup>。バイオテクノロジーでは、一般的なマイクロフィルターメンブレン(以後単にメンブレンとよぶ)は、単に生体分子の濾過や保存のみではなく生体分子の構造や性能などの維持に役立つものが開発されており、その中から85~98%のテラヘルツ波透過率をもつものを選択して使用した。溶液状態の生体分子をウェル内に滴下して乾燥させると、メンブレンの内部にサンプルが均一に塗布できることをSEM(走査電子顕微鏡)によって確認した。

テラヘルツ波の透過測定は、一般的なTHz-TDSシステム<sup>4)</sup>を構築して行った。メンブレンデバイスは二次元スキャンできるステージに搭載し、自動でウェル位置を変えながら透過測定を行えるシステムとなっている。このようなシステムで特徴的な指紋スペクトルなどテラヘルツ分光の有効性が見いだされた生体分子として、核酸塩基類<sup>5)</sup>、タンパク質<sup>5)</sup>、ホルモンなどの生理活性物質<sup>6)</sup>、食品添加

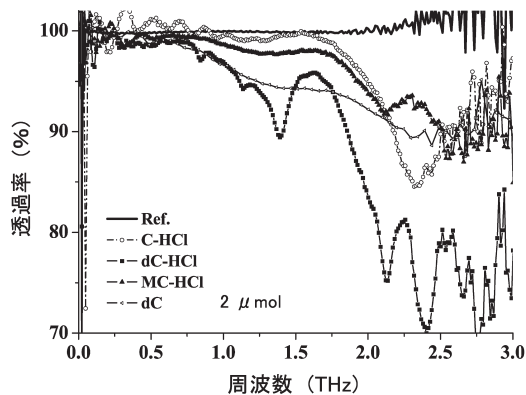


図1 核酸塩基類のテラヘルツ波透過スペクトル。メンブレンデバイスに $2\mu\text{mol}$ を乾燥塗布し、溶液を作製した純水のみで乾燥したものをリファレンスとした。

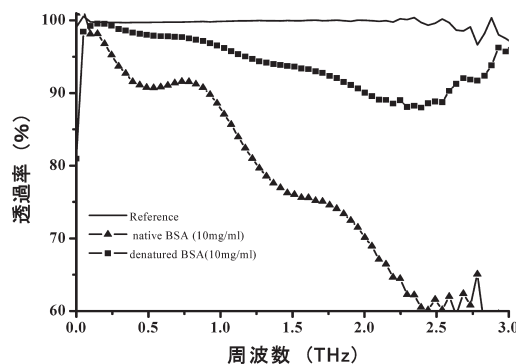


図2 牛血清アルブミン (BSA) のテラヘルツ波透過スペクトル。正常 (native)、変性 (denatured) およびリファレンスとなる溶液を比較。

物などがあり、以下にいくつかの例を紹介する。

### 1.1 核酸塩基類

DNA は、4種類の塩基 (A, G, C, T) に糖やリン酸基を付加したヌクレオチドが連なった長大な2本鎖からなる分子である。生体中では、DNAの塩基は必要に応じてメチル化やアセチル化などの修飾を受けることがよく知られている。DNAの塩基修飾がテラヘルツ領域で検出できれば、遺伝子検査や癌の診断に有用なツールを提供できると期待される。図1は、4種のヌクレオチド、すなわち糖鎖や塩酸塩、およびメチル基がそれぞれ付加された塩基シトシンの水溶液をメンブレンデバイスに滴下し、乾燥させた $2\mu\text{mol}$ のサンプルを測定した結果である。

測定結果より、糖鎖が付加されたシトシン (dC) では特徴的なスペクトルは観測されていないが、塩酸塩のみを付加されているシトシン (C・HCl)、および糖鎖、塩酸塩両方を付加されたシトシン (dC・HCl)、さらにメチル基、塩酸塩両方が付加されたシトシン (MC・HCl) では特徴的な指紋スペクトルが観測された<sup>3)</sup>。このように溶液サンプルを乾燥させて指紋スペクトルを観測することができたが、これらは分子の構造を反映した吸収であると考えられる。このような指紋スペクトルを用いれば、わずかな修飾状態の違いを高感度で検出することができる。

### 1.2 タンパク質

タンパク質である牛血清アルブミン (BSA) 溶液を用いて、正常および変性タンパク質分子の透過スペクトルを比較することで構造識別を試みた<sup>5)</sup>。タンパク質の立体構造 (コンフォメーション) の変化は機能に大きな影響を与えるので、その構造診断は非常に重要である。

サンプルは $10\text{mg/ml}$ の濃度に調整し、変性タンパク質分子は $75^\circ\text{C}$ で3分加熱することで用意した。それぞれ $30\mu\text{l}$ を滴下して乾燥させたところ、図2に示すように、周

波数 $0.2\sim 3\text{THz}$ 領域における特徴的な吸収ピークはみられないが、正常および変性タンパク質の比較では透過率の周波数依存性に顕著な差がみられた。この結果は、滴下するタンパク質のコンフォメーションの変化によって、テラヘルツ波に対する吸収係数および屈折率に差が生じていることを示唆している。その他のタンパク質として、アビジンを用いて測定した結果でも、同様に熱変性したサンプルのテラヘルツ波透過率向上が確認された。

## 2. 高周波伝送線路センサーチップ

1章で述べたメンブレンデバイスを用いた方式では、検体をバルク体として扱うこと、テラヘルツ波を集光して照射させるために $1\text{mm}\phi$ 以上の領域に塗布する必要があることなどから、生体関連材料として十分少量であるとはいえない。そこで、①テラヘルツ帯固有のスペクトル情報を用いて分子識別を行う、②測定環境の影響をあまり受けない、③検体量を減らすために測定領域を波長程度以下の小さい領域に限定する、などの特徴をもつ高周波伝送線路センサーが提案されている<sup>7)</sup>。それは、テラヘルツ波の発生、検出、伝搬を行う機能を同一基板上に集積化させたデバイスで、伝搬させる線路の一部にサンプルを塗布することで状態が変化することをとらえる方式である。

われわれは、図3のように、テラヘルツ波の発生、検出のための光伝導スイッチ素子とテラヘルツ波伝搬のためのマイクロストリップ線路をSi基板上に集積させたセンサーチップを作製した。誘電体としてBCB (benzo-cyclobutene) を用いた場合に、厚さ $3\mu\text{m}$ 、信号線の線路幅 $5\mu\text{m}$ 、信号線の長さ $0.6\text{mm}$ として最適化設計を行った。線路上には $400\mu\text{m}\phi$ の液だめを形成し、液体サンプルを供給すれば一定領域に塗布が可能のため、高感度で再現性の高い分析ができる。励起光パワー $4.8\text{mW}$ 、プローブ光パワー $2.4\text{mW}$ 、発生側光伝導素子の印加電圧を $10\text{V}$ としたとき、検出されたテラヘルツ波パルスは半値幅が約

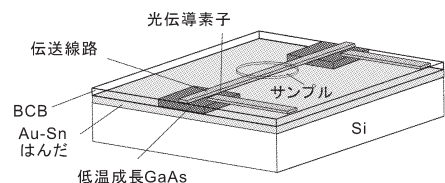


図3 高周波伝送線路センサーチップの構造図。

2.5 ps, 時間波形から計算される高速フーリエ変換 (FFT) スペクトルは帯域 0~2 THz, 最大 S/N 比はパワーで約 10<sup>8</sup> dB が得られた。

生体分子として 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調整した DNA を用い, 2 本鎖 (ds) と 1 本鎖 (ss) の構造判別を試みた。用いた検体は, 5.4 kb 環状 2 本鎖プラスミド DNA, およびそれを 95°C, 3 分で熱変性して 1 本鎖にしたものである。1 回につき 12 nl として複数回塗布を繰り返すと, 塗布量に応じて DNA 検体の複素誘電率を反映したパルスピーク位置の時間シフトが図 4 に示すように観測でき, 1 本鎖と 2 本鎖でシフト量に違いがあることがわかる。この結果は, 光を用いた DNA センサーのような蛍光ラベルを用いることなく DNA 構造の判別が可能であることを示唆しており, そのための検体量としては 60 nl (8.4 fmol に相当) 程度と市販の蛍光方式に迫る感度であった<sup>9)</sup>。

さらに, 同じセンサーデバイスで粉体の分光スペクトル取得を試みた。糖類のサンプルでペレットを作製して通常の THz-TDS であらかじめ透過スペクトルを求めておき, 粉体をガラスプレートで伝送線路部分に押し付けて比較測定を行った。その例として, マルトース水和物の分光スペクトルにみられる 1.1 THz および 1.6 THz のピーク位置はほぼ一致しており, 伝送線路センサーデバイスで物質同定が可能であることを示した。このとき用いた検体量は 7  $\mu\text{g}$  であり, 通常の測定のパレット作製に典型的に必要な量 10 mg のおよそ 1000 分の 1 の量で分析できることがわかった。

微量な生体分子の溶液を扱って, テラヘルツ波で簡便に分光するための検出デバイスを開発した。メンブレンデバイスを用いて分子を吸着する手法では, 核酸塩基類で固有の指紋スペクトル, タンパク質では変性状態による透過スペクトル変化を観測することができた。高周波伝送線路を用いたセンサーチップでは, DNA 検体の構造識別をラベルフリーで 10 fmol 以下, 糖類の粉体において 10  $\mu\text{g}$  以下の微量で分析可能であることを示した。今後, さらにメンブレンデバイスを用いて臨床応用で有効な生体分子データベースを構築し, 集積センサーチップはその高感度検出デ

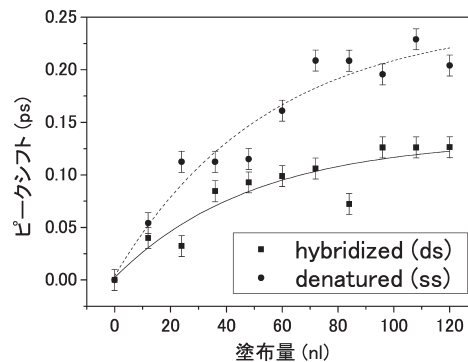


図4 DNA 検体の塗布量と時間波形のピークシフトの関係。ピークシフト量の違いにより DNA の 1 本鎖 (ss)/2 本鎖 (ds) の状態を判別。

バイスとして利用できると考えられる。

本論で紹介した研究は, 理化学研究所と行われた融合的連携研究プログラムの成果であり, 共同研究者である伊藤弘昌教授 (東北大学), 川瀬晃道教授 (名古屋大学), 山下将嗣博士, 米山春子博士 (現 JST), 棚橋晃宏博士 (現 (株)メガオプト) に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) M. Brucherseifer, M. Nagel, P. Haring Bolivar and H. Kurz: "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing," *Appl. Phys. Lett.*, **77** (2000) 4049-4051.
- 2) A. G. Markelz, A. Roitberg and E. J. Heilweil: "Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz," *Chem. Phys. Lett.*, **320** (2000) 42-48.
- 3) H. Yoneyama, M. Yamashita, S. Kasai, K. Kawase, H. Ito and T. Ouchi: "Membrane device for holding biomolecule samples for terahertz spectroscopy," *Opt. Commun.*, **281** (2008) 1909-1913.
- 4) M. Tani, S. Matsuura, K. Sakai and S. Nakashima: "Emission characteristics of photoconductive antennas based on low-temperature-grown GaAs and semi-insulating GaAs," *Appl. Opt.*, **36** (1997) 7853-7859.
- 5) H. Yoneyama, M. Yamashita, S. Kasai, K. Kawase, R. Ueno, H. Ito and T. Ouchi: "Terahertz spectroscopy of native-conformation and thermally denatured bovine serum albumin (BSA)," *Phys. Med. Biol.*, **53** (2008) 3543-3549.
- 6) H. Yoneyama, M. Yamashita, S. Kasai, H. Ito and T. Ouchi: "Utility of micro-filter membrane in THz spectrum of molecules in solution," *Proc. SPIE*, **6853** (2008) 68530X-1-68530X-9.
- 7) M. Nagel, P. Haring Bolivar, M. Brucherseifer and H. Kurz: "Integrated THz technology for label-free genetic diagnostics," *Appl. Phys. Lett.*, **80** (2002) 154-156.
- 8) A. Tanabashi, S. Kasai, R. Kurosaka, H. Yoneyama, M. Yamashita, H. Ito and T. Ouchi: "High sensitive detection of Bio-molecules with integrated THz sensor chip," *IRMMW:THz2007 Conference Proceedings*, Cardiff, MonA 4-5 (2007) pp. 86-87.

(2008 年 9 月 10 日受理)